

文章编号: 1005-6947(2013)03-0305-05

· 基础研究 ·

雷帕霉素对梗阻性黄疸大鼠肝脏的保护作用

张佳凤, 张培建, 蒋永军, 李鹏飞, 骆小江, 伍学艳

(扬州大学第二临床医学院 普通外科研究室, 江苏 扬州 225000)

摘要

目的: 探讨雷帕霉素 (rapamycin) 对梗阻性黄疸 (OJ) 大鼠肝脏的保护作用。

方法: 将 54 只 SD 大鼠随机均分为假手术组, OJ 模型组 (模型组), OJ 模型 + 雷帕霉素治疗组 (治疗组)。采用胆总管结扎方法建立梗阻性黄疸模型, 治疗组大鼠术后给予雷帕霉素 0.4 mg/(kg·d) 皮下注射, 假手术组与模型组同期皮下注射等量生理盐水, 分别于术后 1, 3, 5 d 每组取 6 只大鼠, 行白细胞 (WBC) 计数、血浆内毒素 (ET) 含量与肝功能指标检测; RT-PCR 测肝组织肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 的表达; 观察肝组织病理学变化。

结果: 除假手术组外, 模型组与治疗组大鼠术后均出现 OJ 表现, 但治疗组症状轻于模型组; 模型组与治疗组大鼠 WBC 计数, 血浆谷丙转氨酶 (ALT), 总胆红素 (TBIL), ET 水平, 肝组织 TNF- α mRNA 水平在术后各时间点均较假手术组明显升高 (均 $P < 0.05$); 病理学观察显示, 模型组与治疗组大鼠肝组织均表现为肝血窦扩张, 肝细胞坏死, 胆管细胞增生及炎性细胞浸润等病理改变; 模型组与治疗组间比较, 治疗组以上指标在各时间点上均低于模型组 (均 $P < 0.05$), 病理改变也明显轻于模型组。

结论: 雷帕霉素对梗阻性黄疸大鼠的肝脏具有保护作用, 机制部分可能与其抑制全身炎症反应有关。

关键词

黄疸, 阻塞性; 西罗莫司; 内毒素血症; 肿瘤坏死因子 α

中图分类号: R657.4 文献标志码: A



DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.03.009

<http://www.zpwz.net/Jweb-zgptwk/CN/abstract/abstract3424.shtml>

Hepatoprotective effect of rapamycin in rats with obstructive jaundice

ZHANG Jiafeng, ZHANG Peijian, JIANG Yongjun, LI Pengfei, LUO Xiaojiang, WU Xueyan

(Institute of General Surgical Research, the Second School of Clinical Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

Corresponding author: ZHANG Peijian, Email: yzu.edu.pjz@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the hepatoprotective effect of rapamycin in rats with obstructive jaundice (OJ).

Methods: Fifty-four SD rats were equally randomized into sham operation group, OJ model group (model group) and OJ model plus rapamycin treatment group (treatment group). The rat OJ model was established by common bile duct ligation. Rats in treatment group received rapamycin 0.4 mg/kg once daily by subcutaneous injection after operation, and rats in both sham operation group and model group were given normal saline

基金项目: 江苏省扬州市科技创新资助项目 (YZ2009051); 江苏省扬州市科技计划资助项目 (YZ2010087)。

收稿日期: 2012-05-15; 修订日期: 2013-02-15。

作者简介: 张佳凤, 扬州大学第二临床医学院硕士研究生, 主要从事肝胆胰方面的研究。

通信作者: 张培建, Email: yzu.edu.pjz@163.com

of the same volume instead. Six rats in each group were sacrificed at the postoperative day (POD) 1, 3 and 5 respectively, and the white blood cell (WBC) count, plasma endotoxin (ET) level and liver function parameters were determined, the mRNA expression levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) in the liver tissues were measured by RT-PCR and liver pathological changes were also observed.

Results: Except for the rats in sham operation group, rats in both model group and treatment group presented overt OJ manifestations, but those of rats in treatment group were milder than those in model group; the WBC count, plasma levels of alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL) and ET as well as the TNF- α mRNA level in the liver tissue were significantly higher in both model group and treatment group than those in sham operation group at each observation time point (all $P < 0.05$). As shown by pathological studies in the liver specimens from rats in both model group and treatment group, there were pathological changes that included the dilatation of liver sinusoids, hepatocyte necrosis, hyperplastic bile duct cells and inflammatory cell infiltration. The comparison between model group and treatment group showed that all the determined variables were significantly lower in treatment group than those in model group at each observation time point (all $P < 0.05$), and liver pathological damages were also milder in treatment group than those in model group.

Conclusion: Rapamycin has hepatoprotective effect in OJ rats, and the mechanism may be partially due to its inhibition of the systemic inflammatory response.

KEY WORDS Jaundice, Obstructive; Sirolimus; Endotoxemia; Tumor Necrosis Factor α

CLC number: R657.4 **Document code:** A

DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.03.009

雷帕霉素 (rapamycin) 是 20 世纪 70 年代初由加拿大 Ayerst 研究所从放线菌培养液中分离出来的大环内酯类抗生素, 随着近几年研究的不断深入雷帕霉素及其类似物被证明是很有前途的免疫抑制剂和抗肿瘤制剂, 因其结构与 FK-506 相似, 可以阻断 JAK/STAT 信号转导通路而成为近几年研究热点。梗阻性黄疸 (obstructive jaundice, OJ) 是由于肝外胆管各种原因阻塞所引起的胆汁淤积症, 是临床上比较常见的一种病, 因可释放多种细胞因子及炎性介质导致肝细胞损伤, 同时肠道细菌易位产生肠源性内毒素血症 (intestinal endotoxemia, IETM) 及全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 严重者可导致肝肾等多脏器功能衰竭。本实验探究雷帕霉素对梗阻性黄疸大鼠肝脏是否有一定的保护作用, 从而为实验研究和临床治疗提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

雷帕霉素 (上海生工生物科技发展有限公司); RT-PCR 试剂盒、Trizol 总 RNA 提取试剂、

cDNA 第一链合成试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司); AV800 全自动生化分析仪 (日本日立公司); PCR 循环仪 (杭州晶格科学仪器有限公司); 电泳仪 (南京普阳科学仪器研究所)。

1.2 动物分组

扬州大学动物实验中心提供清洁级 SD 雄性大鼠 54 只, 鼠龄 10~12 周, 体质量 250~300 g, 随机分为假手术组, OJ 模型组 (模型组), OJ 模型 + 雷帕霉素治疗组 (治疗组), 每组 18 只。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制作 大鼠术前 12 h 禁食, 自由饮水。2 mL 乙醚吸入麻醉, 常规消毒铺巾, 正中切口入腹, 将肝脏向上牵拉, 牵拉十二指肠, 暴露胆总管近十二指肠的根部, 假手术组游离胆总管末端但不结扎, 关腹; 模型组与治疗组游离胆总管后于近十二指肠系膜处以 4-0 号丝线结扎, 关腹, 制作 OJ 模型。

1.3.2 处理方法 治疗组大鼠术后予雷帕霉素 0.4 mg/(kg·d) 皮下注射。假手术组与模型组术后相同时段每只大鼠给予 0.4 mg/(kg·d) 生理盐水皮下注射直至处死。分别于术后 1, 3, 5 d 每组取 6 只大鼠, 取下腔静脉取血与肝脏组织。

1.4 检测指标

(1) 动物一般情况; (2) 下腔静脉血白细胞(WBC)计数; (3) 赖氏法检测肝功能血浆谷丙转氨酶(ALT)活性、苯甲酸钠-咖啡因法检测总胆红素(TBIL)含量; (4) 内毒素水平(ET)水平测定: 下腔静脉取血约1 mL, 室温静置1 h, 常温下3 000 r/min离心15 min取血清, 置于EP管中-80 °C冰箱保存, 显色基质法测定各组ET水平; (5) RT-PCR法检测肝脏组织中TNF- α mRNA的表达: 称取肝组织30 mg, 以异硫氰酸胍一步法提取细胞总RNA。对转录产物进行扩增, 以大鼠肌动蛋白(Rat-actin)作为内参对照。Rat-actin: 5'-GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC-3' (上游), 5'-CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TTT C-3' (下游)。TNF- α : 引物5'-AGC CGA TTT GCC ATT TCA T-3' (上游); 引物5'-GCC ACT ACT TCA GCG TCT CG-3' (下游)。PCR反应参数: 95 °C 5min; 95 °C 40 s, 56 °C 30 s, 72 °C 35 s, 28个循环, 末次延长10 min。扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳后照相, 底片采用图像分析处理系统进行分析, 通过目的基因与内参对照的积分吸光度比值表示mRNA相对表达量; (6) 取肝脏左外叶进行HE染色病理分析。

1.5 统计学处理

实验数据用均数 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示。各指

标分组间比较, 方差齐者用方差分析及两两比较的 q 检验; 方差不齐者, 采用秩和检验。所有数据采用SPSS 13.0统计软件包进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况观察

术后第2天开始治疗组和模型组均出现皮肤黄染, 大鼠食欲变差, 尿色变黄, 粪便颗粒数减少并且有颜色变浅趋势, 反应迟钝, 处死时剖腹探查可见腹腔有不同程度腹水, 胆总管扩张, 充满胆汁, 肝脏淤胆, 肠壁存在不同程度水肿, 并可见存在不同程度腹腔粘连, 出血时间相对延长, 模型组较治疗组更明显; 假手术组无上述变化, 并且腹腔脏器基本正常。

2.2 血WBC计数, TBIL, ALT, ET水平的变化

假手术组各项指标在术后1, 3, 5 d的差异无统计学意义(均 $P > 0.05$); 与假手术组比较, 模型组与治疗组术后各时间点的WBC计数, TBIL水平, ET水平均明显增高(均 $P < 0.05$), 其中WBC计数与TBIL水平在术后随时间逐渐增高, ALT和ET水平在术后3 d升高最为明显, 治疗组以上各项指标在各时间点上均明显低于模型组(均 $P < 0.05$)(表1)。

表1 各组大鼠不同时间点的WBC计数, TBIL, ALT, ET水平的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the WBC count, and levels of TBIL, ALT and ET of rats in each group ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	WBC ($\times 10^9/L$)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)	ALT (U/L)	ET (EU/mL)
假手术组				
1 d	7.24 \pm 0.37	5.67 \pm 1.04	33.79 \pm 2.48	1.0660 \pm 0.0021
3 d	7.58 \pm 0.39	5.65 \pm 1.09	34.45 \pm 2.51	1.0681 \pm 0.0023
5 d	7.45 \pm 0.38	5.68 \pm 1.08	33.87 \pm 2.49	1.0671 \pm 0.0022
模型组				
1 d	18.79 \pm 4.45 ¹⁾	94.40 \pm 3.91 ¹⁾	66.50 \pm 1.29 ¹⁾	7.2336 \pm 0.1216 ¹⁾
3 d	19.53 \pm 3.72 ¹⁾	153.96 \pm 42.87 ¹⁾	691.50 \pm 48.32 ¹⁾	7.5868 \pm 0.1733 ¹⁾
5 d	20.44 \pm 2.01 ¹⁾	168.80 \pm 25.88 ¹⁾	458.67 \pm 124.12 ¹⁾	7.3724 \pm 0.0161 ¹⁾
治疗组				
1 d	9.87 \pm 0.61 ^{1), 2)}	80.23 \pm 16.73 ^{1), 2)}	53.33 \pm 1.75 ^{1), 2)}	4.3970 \pm 0.0875 ^{1), 2)}
3 d	10.80 \pm 0.15 ^{1), 2)}	112.90 \pm 10.15 ^{1), 2)}	141.20 \pm 7.85 ^{1), 2)}	4.6257 \pm 0.0715 ^{1), 2)}
5 d	10.00 \pm 0.68 ^{1), 2)}	113.35 \pm 24.25 ^{1), 2)}	119.60 \pm 33.73 ^{1), 2)}	4.4274 \pm 0.0650 ^{1), 2)}

注: 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

1) $P < 0.05$ vs. sham operation group; 2) $P < 0.05$ vs. model group

2.3 各组肝脏组织TNF- α mRNA的表达

模型组与治疗组肝组织TNF- α mRNA含量于术后1 d即开始升高, 3 d达峰值, 5 d时有所

下降, 与假手术组比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 但治疗组肝组织TNF- α mRNA含量在各时间点均明显低于模型组(均 $P < 0.05$)(图1)。

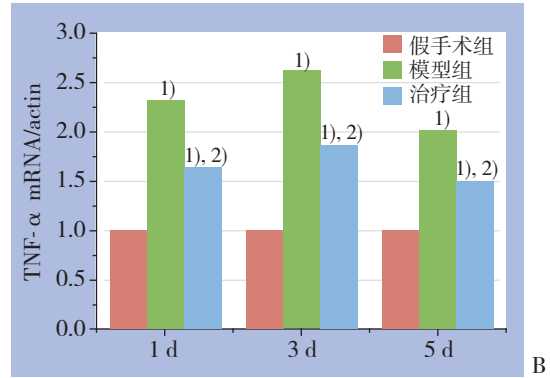
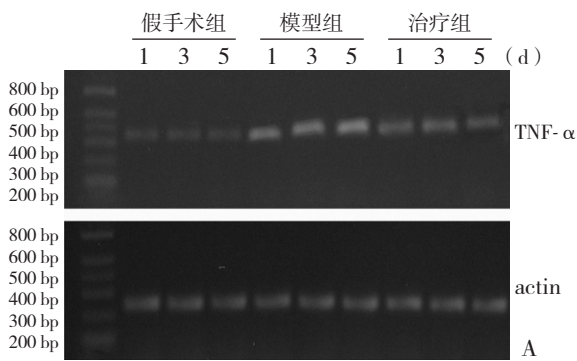


图 1 各组肝脏组织 TNF- α mRNA 表达检测结果 A: TNF- α mRNA 凝胶电泳图; B: 相对灰度值比较 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

Figure 1 Results of liver TNF- α mRNA expression measurement of each group A: Gel electrophoresis of TNF- α mRNA; B: Comparison of the relative gray values 1) $P < 0.05$ vs. sham operation group; 2) $P < 0.05$ vs. model group

2.4 光镜下肝组织病理学变化

假手术组大鼠肝组织学结构未见异常, 肝细胞自中央静脉向周边辐射, 肝索排列整齐, 汇管区可见小叶间静脉、小叶间动脉和胆小管; 模型组和治疗组大鼠肝血窦扩张, 胆管细胞增生伴炎

性细胞浸润, 肝细胞浊肿。随着时间的延长, 模型组肝血窦扩张、小叶中央性淤胆及炎性细胞浸润较治疗组更加明显, 网状纤维增多, 肝小叶结构破坏, 纤维增生明显 (图 2)。

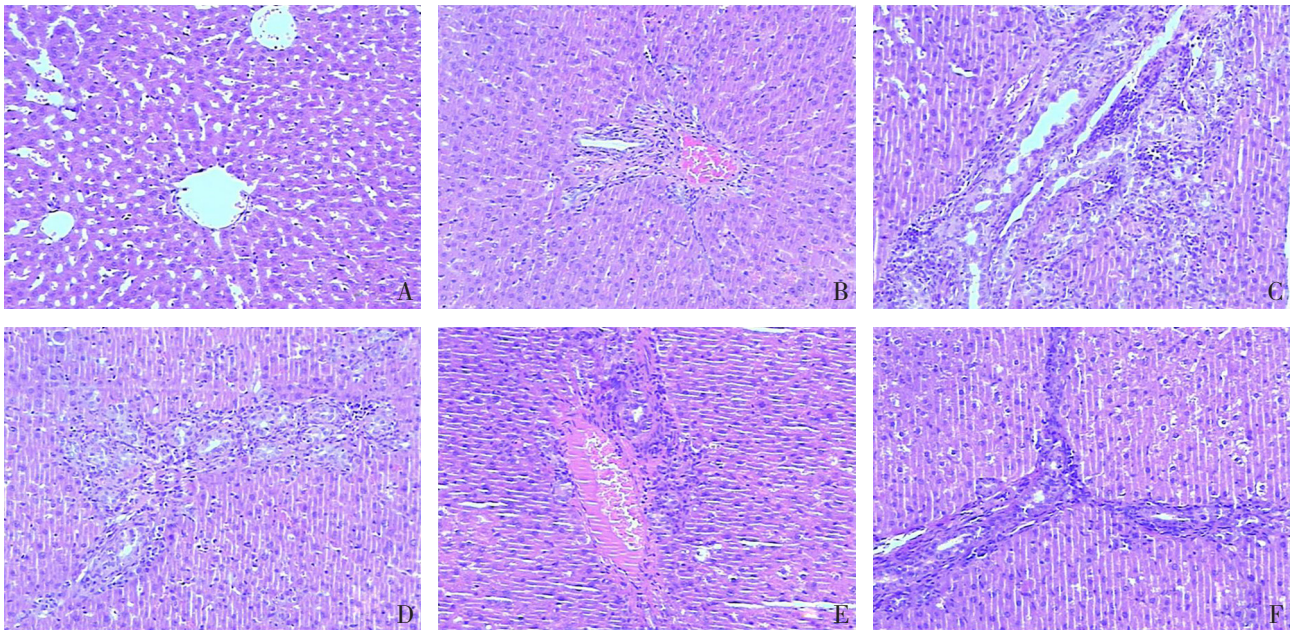


图 2 术后 5 d 各组大鼠肝脏组织病理学改变 (HE $\times 400$) A, B: 假手术组; C, D: 模型组; E, F: 治疗组
Figure 2 The pathological findings in liver tissues of rats at POD 5 (HE $\times 400$) A, B: Sham operation group; C, D: Model group; E, F: Treatment group

3 讨 论

雷帕霉素又称西罗莫司, 是一种新型的大环内酯类药物, 是西方研究人员于 1975 年首先发现的一种由土壤链霉菌分泌的次生代谢物, 其结构与 FK-506 相似, 能通过阻断 STAT3 727 位丝

氨酸的磷酸化, 从而抑制 STAT3 活化和核转位, 进一步下调细胞因子的诱生及病理生理效应^[1-2]。随着近几年研究的不断深入雷帕霉素及其类似物被证明是很有前途的免疫抑制剂和抗肿瘤制剂, 最新研究表明雷帕霉素通过不同的细胞因子受体阻断信号传导, 阻断 T 淋巴细胞及其它细胞由

G₁期至S期的进程,从而发挥免疫抑制效应,因此其被广泛应用于肾脏、心脏、肝脏和胰腺移植的实验研究。而余浩清等^[3]也报道过雷帕霉素对肝癌化疗有增敏作用。不仅如此,其对卵巢癌,宫颈癌,子宫内膜癌和直肠癌都起到一定的治疗作用^[4-5]。Erlich等^[6]对其治疗创伤性脑损伤也做过相关研究,但其对梗阻性黄疸疗效至今鲜有报道。

OJ常伴随内毒素血症,近几年研究认为OJ时内毒素血症的发生机制趋向于肠源性学说及单核-巨噬细胞系统障碍学说。OJ时由于胆盐缺乏、肠黏膜屏障功能受损、机体免疫抑制等因素往往导致肠道菌群过度繁殖异位,吸收入血引起内毒血症。TNF- α 是由单核细胞、巨噬细胞、T细胞和肥大细胞产生的一种炎症因子,适量的TNF- α 可发挥免疫调节作用、抗病毒、抗感染、杀伤肿瘤细胞的作用,但分泌过多或调节失控时可引起发热、休克及多脏器功能损害。OJ时引起TNF- α 水平升高的原因很多,但主要与内毒素血症有关^[7]。随着研究的不断深入,TNF- α 可以通过抑制线粒体呼吸链复合物,使肝细胞内过氧化物生成增加,细胞内钙超载,诱导血管内皮细胞的通透性增加,使血管内皮的黏附分子表达上调等机制对肝脏造成损伤,并且TNF- α 可促进多核白细胞的积聚和激活,激活的白细胞在TNF- α 作用下可释放血小板活化因子,IL-6, IL-2, IL-8, 一氧化氮,血栓素A₂,前列腺素,氧自由基(OFR)等,这些炎性介质又可正反馈促进TNF- α 等细胞因子产生,从而形成“瀑布”样级联反应,TNF- α 不仅对肝功能有影响,而且也是引起心、肺、肾、胃肠等损害的重要介质^[8-15]。

本研究显示,雷帕霉素治疗后的OJ组大鼠,OJ症状改善,雷帕霉素组WBC计数,血ALT、TBIL、ET水平,肝组织TNF- α 表达等指标明显降低,病理改变明显减轻,表明雷帕霉素在抑制炎性反应,降低肿瘤坏死因子的表达,减轻黄疸,保护肝功能有一定的作用,但是其具体机制和长期疗效有待进一步探讨。

参考文献

[1] Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, et al. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNIF signaling is mediated by the rapamycin target Mtor[J]. *Curr Biol*, 2000, 10(1):47-50.

- [2] 邹君杰,杨宏宇,朱毅,等.雷帕霉素纳米粒对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用[J].*中国普通外科杂志*, 2012, 21(6):682-686.
- [3] 余浩清,白宁,胡可,等.雷帕霉素对肝癌化疗的增敏作用及相关机制研究[J].*中南药学*, 2011, 9(2):85-88.
- [4] Victoria L, Bae-Jump, Chunxiao Zhou et al. Rapamycin inhibits hTERT telomerase mRNA expression, independent of cell cycle arrest[J]. *Gynecologic Oncology*, 2006, 100(3):487-494.
- [5] Sun QL, Liu QY, Zheng YY, et al. Rapamycin suppresses TLR4-triggered IL-6 and PGE2 production of colon cancer cells by inhibiting TLR4 expression and NF- κ B activation[J]. *Molecular Immunology*, 2008, 459(10):2929-2936.
- [6] Erlich S, Alexandrovich A, Shohami E, et al. Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 26(1):86-93.
- [7] 程飞,胡坚方.内毒素与TNF- α 所致肝损害的关系及其治疗[J].*江西医药*, 2008, 43(8):863-866.
- [8] Stadler J, Bentz RG, Harbrencht BG, et al. Tumors factor alpha inhibits hepatocyte mitochondrial respiration[J]. *Ann Surg*, 1992, 216(5):539-546.
- [9] Admson GM, Billings RE. Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 294(1):223-229.
- [10] Farkas G, Múrtón J, Nagy Z, et al. Experimental acute pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in the rat: a potential role for tumor necrosis factor and interleukin6 [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 242(3):147-150.
- [11] Riché FC, Cholley BP, Laisné MJ, et al. Inflammatory cytokines, C reactive protein, and procalcitonin as early predictors of necrosis infection in acute necrotizing pancreatitis [J]. *Surgery*, 2003, 133(3):257-262.
- [12] Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, et al. Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: Relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness [J]. *Surgery*, 2002, 132(1):86-92.
- [13] 杨智勇,王春友,陶京,等.早期血液滤过对重症急性胰腺炎家猪TNF- α 及IL-1 β 水平的影响[J].*中国普外基础与临床杂志*, 2004, 11(5):433-435; 439.
- [14] 巩鹏,王忠裕,赵作伟,等.梗阻性黄疸大鼠心肌TNF- α 及SOD基因mRNA的表达[J].*中国普外基础与临床杂志*, 2004, 11(6):502-504.
- [15] 韩德兰,刘丽,赵芝,等.梗阻性黄疸大鼠肝改变与TNF- α 的关系[J].*河北医药*, 2010, 32(17):2322-2323.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:张佳凤,张培建,蒋永军,等.雷帕霉素对梗阻性黄疸大鼠肝脏的保护作用[J].*中国普通外科杂志*, 2013, 22(3):305-309. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.03.009
Cite this article as: ZHANG JF, ZHANG PJ, JIANG YJ, et al. Hepatoprotective effect of rapamycin in rats with obstructive jaundice[J]. *Chin J Gen Surg*, 2013, 22(3):305-309. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.03.009